Untersuchung der Reaktionskinetik des Enzyms Aconitase mit Hilfe markierter Substrate

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius - Maximilians - Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Diplomchemikerin Ursula Olpp
geboren in Levern in Westfalen

Würzburg 1956

Untersuchung der Reaktionskinetik des Enzyms Aconitase mit Hilfe markierter Substrate

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius - Maximilians - Universität
zu Würzburg

P UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von
Diplomchemikerin Ursula Olpp
geboren in Levern in Westfalen

Würzburg 1956

Eingereicht am: 2.7.1956
1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Martius
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Fischer
Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.1957

Die vorliegende Arbeit wurde 1952-1956 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. C. M a r t i u s im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen und im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. C. M a r t i u s für seine wertvollen Hinweise und seine stete grosszügige Hilfe. Herrn Professor Dr. A. B u t e n a n d t bin ich für das wohlwollende Entgegenkommen bei der Ausführung der Synthesen zu Dank verpflichtet.

Inhaltsübersicht

I Einleitung

II Methoden
- A) Synthesen
  - 1) Aconitsäuresynthese
  - 2) Synthetische Gewinnung optisch aktiver Isocitronensäure
- B) Analysenverfahren
  - 1) Papierchromatographische Trennung
  - 2) Säulenchromatographische Trennung
  - 3) Isotopenmessungen
  - 4) Gehaltsbestimmungen

III Experimenteller Teil
- A) Ausgangsstoffe und Vorversuche
  - 1) Acetylendikarbonsäureester
  - 2) Essigsäure- und Malonsäureester
  - 3) Versuche zur Aconitsäuresynthese
- B) Synthese radioaktiver Aconitsäure
  - 1) Carbonierungsreaktion und Veresterung
  - 2) Trans-Aconitsäure
  - 3) Cis-Aconitsäure
- C) Gewinnung optisch aktiver Isocitronensäure
- D) Trennungsverfahren und Analysen
  - 1) Papierchromatographie
  - 2) Verteilungschromatographie mit Celite
  - 3) Bestimmung von Aconit- und Isocitronensäure
- E) Fermentversuche

IV Besprechung der Fermentversuche
- A) Versuche mit ^{14}C-Aconitsäure
- B) Versuche mit ^{14}C-Citronensäure
- C) Discussion
- D) Zusammenfassung

V Anhang
Formelblatt und Literaturnachweis

I EINLEITUNG

Die wichtige Rolle der Citronensäure im Zwischenstoffwechsel ist bekannt. Sie entsteht aus Acetyl-Coenzym A und Oxalacetat und wird von Aconitase umgesetzt zu Isocitronen- und Aconitsäure. Isocitronensäure kann dann dehydriert werden und wird über den Citronensäurezyklus weiter abgebaut (1).
Während über die Fermente des Zyklus im allgemeinen übereinstimmende Vorstellungen herrschten, war man sich zu Beginn dieser Arbeit noch nicht darüber einig, ob Aconitase aus einem einzigen oder aus zwei Enzymen bestehe.

Martius hat es zunächst für wahrscheinlich gehalten, dass sein Ferment mit Fumarase, die ja ebenfalls reversibel Wasser an eine Doppelbindung anlagert, identisch sein könne. Er erkannte aber, dass er eine neue Hydratase vor sich hatte (2), was auch von anderer Seite bewiesen wurde (3).
Jacobsohn u.M. traten dann für die Existenz zweier individueller Enzyme ein: α - und ß-Aconitase (4). Die Versuche, auf die sich die Autoren stützten, wurden jedoch von Martius und Leonhardt widerlegt (5). Später beobachtete Racker (6) an Aconitase aus Herzmuskel und Hefe, dass sich bei Reinigung die sogenannte "Isocitraseaktivität" stärker anreicherte als die "Citraseaktivität". Es gelang ihm jedoch ebensowenig wie Jacobsohn, zwei verschiedene Fermentproteine zu isolieren. Andere Autoren haben Aconitase noch besser gereinigt als Racker; sie konnten aber bei ihren Versuchen solche Unterschiede nicht finden (7,8,10).

Weil sich offensichtlich die Frage nach der Einheitlichkeit der Aconitase auf präparativem Wege nicht einfach würde lösen lassen (9), versuchten Friedrich-Freksa und Martius (11), sie auf kinetischem Wege zu klären. Sie diskutieren dabei drei Möglichkeiten: (s.Formelbl.S.46)

1. Es handelt sich bei der Aconitase um ein einziges Enzym, es liessen sich dann zwei Fälle denken:
   a) Aconitsäure ist obligatorisches Zwischenprodukt bei der Umwandlung von Citronensäure in Isocitronensäure und umgekehrt.
   Oder:
   b) Über eine gemeinsame Fermentzwischenverbindung geht jede der drei Säuren unmittelbar in eine der anderen über.
2. Es handelt sich bei der Aconitase um einen Komplex aus zwei Enzymen. Von ihnen katalysiert das eine die reversible Wasseranlagerung an Aconitsäure zu Citronensäure, das andere diejenige zu Isocitronensäure.

Übereinstimmung zwischen Rechnung und Experiment trat am besten im Falle 1b, weniger befriedigend auch im letzten Falle ein. Die Frage: "Besteht Aconitase aus zwei Fermenten oder aus nur einem?" schien sich danach zu der Folgerung zuzuspitzen: Entweder können die beiden Oxysäuren nur über Aconitsäure ineinander übergeführt werden (Zwei-Ferment-Theorie) oder aber direkt, d.h. sozusagen an der Aconitsäure vorbei (Ein-Ferment-Theorie).

Nach Beginn meiner Arbeit sind noch verschiedene Untersuchungen anderer Autoren zur Wirkungsweise der Aconitase veröffentlicht worden.
Krebs und Holzach (12) haben Versuche bekanntgegeben, nach denen bei der Bildung von Isocitronensäure aus Citronensäure eine "lag"-Periode auftritt.Prüft man ihre Angaben näher, so findet man, dass sie sich auf Werte stützen, deren Fehlerbreite so gross wie die gemessene Abweichung ist. Ihre Ergebnisse sind inzwischen von anderer

Seite teils bestätigt, teils bestritten worden (14,10). Ausserdem hat Kacser (15) durch einen kinetischen Ansatz, der sich aber ausschliesslich auf fremde Messungen stützt, gezeigt, dass sich auch für nur ein Ferment beweisen lässt: Der Reaktionsweg verläuft über Aconitsäure als zwangsläufiges Zwischenprodukt. Die kinetischen Daten sind also offensichtlich mehrdeutig. (s.Formelblatt S.46)
Im Widerspruch dazu hat Tomizawa die Theorie von Freksa und Martius erweitert und verfeinert. Er hat aufschlussreiche und folgerichtig angelegte Versuchsreihen veröffentlicht, die seine Theorie stützen (10,13,16). Wie er hat auch Speyer (17) mit Isotopenversuchen zu beweisen versucht, dass die Aconitsäure nicht als notwendiges Zwischenprodukt gelten dürfe. (s.Formelblatt S.46)
Morrison (18) konnte dann 1954 mitteilen, dass er aus tierischem Material eine zu 80 % reine, elektrophoretisch einheitliche Aconitase gewonnen hat. Ein Jahr später hat Neilson über zwei verschiedene Aconitaseproteine berichtet, die sie aus Aspergillus niger isolieren konnte (19). Nun hat es sich in vielen Fällen gezeigt, dass der enzymatische Apparat der Mikroorganismen von dem der höher entwickelten Organismen abweicht. Der Befund von Neilson ist daher für die tierische Aconitase nicht ausschlaggebend, kennt man doch auch eine andersartige Aconitase bei Pseudomonas aeruginosa (20).
Die in der jüngsten Zeit mit gereinigter tierischer Aconitase durchgeführten kinetischen und präparativen Versuche haben die beteiligten Autoren zu der Schlussfolgerung geführt, dass es sich bei diesem Ferment um nur ein Enzym mit nur einem spezifischen Wirkungszentrum handele (10,13,14,15,16,17,18). Strittig ist noch die Frage des Reaktionsweges. Die Verfechter der Ansicht, Aconitsäure sei zwangsläufiges Zwischenprodukt (12,15,14) , haben dafür bisher keine experimentellen Beweise bringen können, die sich nicht auch mit der Theorie Tomizawas würden

deuten lassen, die ja diese Bedingung fallen lässt, wie es schon Freksa und Martius gefordert haben.
Aufgabe meiner Arbeit sollte es sein, durch Isotopenversuche zur Klärung des Chemismus der Aconitasewirkung beizutragen. Es sollte enzymatisch Isocitronensäure in Citronensäure bei Gegenwart einer sehr kleinen Menge markierter Aconitsäure umgewandelt werden. Aus der Isotopenverteilung sollten sich Rückschlüsse darauf ergeben, ob die Umwandlung von Isocitronensäure in Citronensäure ausschliesslich über Aconitsäure führe oder zum Teil an dieser vorbei. In weiteren Ansätzen wurde dasselbe angestrebt durch Verwendung markierter Citronensäure, wobei aber von den Gleichgewichtsconcentrationen der drei Komponenten ausgegangen wurde. Die für diese Versuche nötige markierte Aconitsäure wurde synthetisch hergestellt. Aus ihr wurde durch Wasseranlagerung mittels Aconitase markierte Citronensäure gewonnen.

II METHODEN

A) Synthesen

1) Aconitsäuresynthese

Die übliche Darstellung von Aconitsäure durch Dehydratation von Citronensäure (22) kam zur Gewinnung markierter Aconitsäure nicht in Frage. Brauchbar erschien von den bekannten Bildungsweisen jedoch die Anlagerung von Natriummalonester an Acetylendikarbonester nach Michael (23), wobei äquivalente Mengen der beiden Verbindungen eingesetzt werden. ^{14}C führt man am vorteilhaftesten über Malonester ein, weil dieser sich mit guter Isotopenausbeute aus radioaktivem Kohlendioxyd darstellen lässt. Der üblichen Gewinnung nach Grignard (21) wurde die Carbonierung eines Essigsäureesters nach Hauser (25) vorgezogen.

Formulierung: +)

a) $CH_3COOR + NH_2^- \longrightarrow (CH_2COOR)^- + NH_3$

$(CH_2COOR)^- + {}^{14}CO_2 \longrightarrow ROOCCH_2{}^{14}COO^-$ Ausbeute 60-100 %

b) $ROOCCH_2{}^{14}COOH + CH_2N_2 \longrightarrow ROOCCH_2{}^{14}COOCH_3 + N_2$ Ausbeute 80-90 %

+) $R = -C(CH_3)_3$

Während Hauser u.M. Kohlensäureeis im Überschuss anwenden und höchstens 60 % Ausbeute (mit t-Butylessigsäureester) erzielen, liess sich hundertprozentiger Umsatz des eingesetzten Kohlendioxyds erreichen, wenn man von mehr als der äquivalenten Menge Essigester ausging (Tabelle, für die angeführte Versuchsreihe wurde Essigsäureisopropylester benutzt). Wegen dieser ausgezeichneten Ausbeute in bezug auf Kohlendioxyd eignet sich die Synthese gut zur Einführung von isotopem Kohlenstoff.

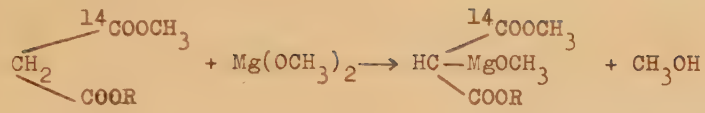
Tabelle

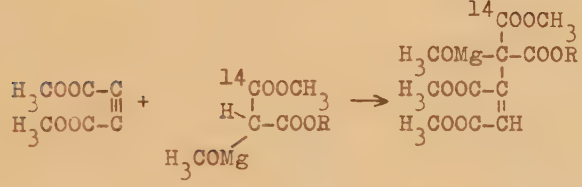
Eingeleitete Menge CO_2 in Mol% des eingesetzten Essigsäureesters	Ausbeute in %, bezogen auf das eingesetzte CO_2 (bestimmt durch Titration des Halbesters)
25	80 - 100
33	66
50	64
50	66
100	67

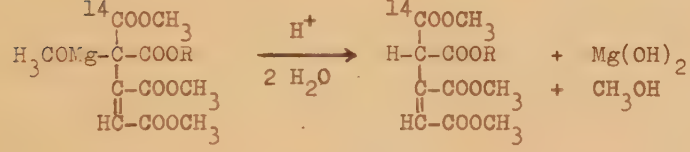
Wie Michael (23) fand, kondensiert sich Natriummalonester mit Acetylendikarbonester in "guter Ausbeute" zu einem Tetrakarbonester, dessen Verseifung und Dekarboxylierung Aconitsäure liefert. Diese Reaktion konnte verbessert werden, indem die Magnesiumverbindung des Malonesters (26) eingesetzt wurde.

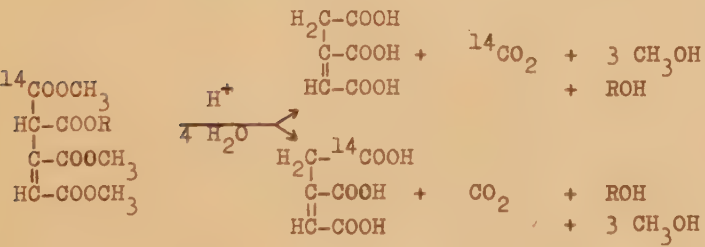
Geht man von dem t-Butyl-methylmalonester aus, erhält man - wie unten formuliert - einen Tetrakarbonester, bei dem von den beiden Karboxylgruppen, die an dem gleichen Kohlenstoffatom stehen, die isotop markierte mit Methanol verestert ist, die andere hingegen mit t-Butanol. Bei gewöhnlicher Dekarboxylierung müssten also 50 % der Radioaktivität verloren gehen. Bekanntlich spalten einige der Ester des t-Butylalkohols (25b,27) pyrolytisch Isobuten ab. Wenn dies auch bei dem Tetrakarbonester eingetreten wäre (siehe:d'), so würde dadurch die Isotopenausbeute verbessert worden sein. Leider war dies nicht der Fall.

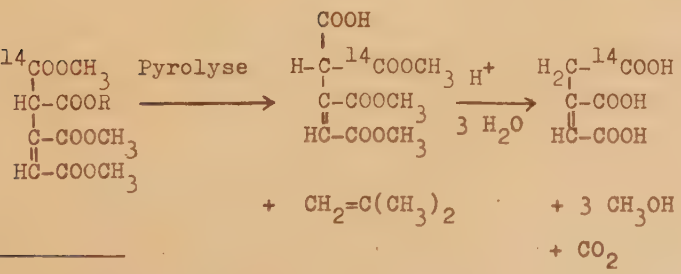
Formulierung [+] :

a) 

b) 

c) 

d) 

d') 

[+] R = $-C(CH_3)_3$

Wie man sieht, enthält die primäre Karboxylgruppe der entstandenen Aconitsäure das radioaktive Kohlenstoffatom. Die chemische Gesamtausbeute bis zur reinen trans-Aconitsäure betrug 40 - 50 % (bezogen auf 100 % Umsatz in der Karbonierungsreaktion), die Isotopenausbeute bis zum Malonester 60 - 70 % (was nur bei nahezu hundertprozentigem Umsatz des radioaktiven Kohlendioxyds möglich ist). Da bei der Dekarboxylierung fast 50 % der Aktivität verloren gingen, lag die Isotopenausbeute für Aconitsäure insgesamt bei 25 %.
Trans-Aconitsäure ist die bei normaler Temperatur beständige Form der Säure. Sie wird aber vom Enzym nicht angegriffen, weil dieses auf die labile cis-Form der Aconitsäure eingestellt ist (28). Jeweils bei Bedarf wurden daher kleine Mengen trans-Säure ins cis-Anhydrid überführt (Malachowsky u.M. 29a), das schon in der Kälte mit Soda oder Alkali das Salz der cis-Form liefert.

2) Synthetische Gewinnung optisch aktiver Isocitronensäure

Nur eine der vier stereoisomeren Formen der Isocitronensäure wird von Aconitase umgesetzt (2).Daher war es angebracht,dieses natürliche Isomere als Substrat einzusetzen. Man kann die natürliche Säure entweder aus pflanzlichem Material gewinnen (30-34) oder enzymatisch aus cis-Aconitsäure nach Martius (2). Aus diesen Versuchen stammend , standen mir 150 mg reines Dimethylesterlacton der natürlichen Form der Isocitronensäure zur Verfügung, die für meine Versuche aber nicht reichten. Eine einfache chemische Darstellungsmethode wäre sehr erwünscht. Obwohl die nach Fittig (35) synthetisch erhaltene Isocitronensäure aus nur einem Antipodenpaar besteht (2), hat sie selbst sich noch nicht aufspalten lassen (Martius,unveröffentlichte Versuche; 31). Auf verschiedene Weise hatte ich

versucht, Trichlormethylparaconsäure, ihre Vorstufe bei der Fittigschen Synthese, in die beiden Antipoden zu zerlegen. Das war zwar mit Brucin gelungen, aber nur unbefriedigend. Als Substrat benutzte ich nun ausser reiner d-Isocitronensäure aus dem erwähnten Dimethylesterlacton eine nicht ganz einheitliche (+)Isocitronensäure (ca.70 % (+)-Form) oder auch racemische Säure. +)

B) Analysenverfahren

Citronen-, Isocitronen- und Aconitsäure lassen sich schwer sauber voneinander trennen: Einmal sind sie recht nah verwandt und ausserdem wandeln sich zweie von ihnen sehr leicht in andere Verbindungen um, nämlich Isocitronensäure in das Lacton und cis-Aconitsäure in die trans-Verbindung.

1) Papierchromatographische Trennung

Ein Gemisch von Citronen- und Isocitronensäure kann man trennen nach dem von Martius u.M.(37) verbesserten Verfahren von Lugg und Overell, wenn man sich auf geringe Substanzmengen beschränkt (bis zu ca. 10 γ pro Startpunkt); andernfalls überlagern sich die Flecke. Cheftel u.M.(67) überführen vor der Analyse Isocitronensäure in ihr Lacton und befreien so die schneller wandernde Lactonsäure von zugesetzter Citronensäure. Das empfiehlt sich aber nicht, wenn - wie im vorliegenden Falle - auch cis-Aconitsäure einwandfrei isoliert werden soll; denn diese erscheint an der gleichen Stelle wie das Lacton im Gegensatz zur rascher laufenden trans-Form.

+) Kürzlich sind Arbeiten von Greenstein u.M.(36) erschienen. Sie leiten darin die Konfiguration der natürlichen Isocitronensäure ab, die sie aus α-Aminotricarballylsäure hergestellt haben (Ausbeute: 1,5 - 2,5 %).

Die Trennung liess sich auch mit anderen papierchromatographischen Verfahren nicht verbessern. Diese Analysenmethode wurde daher nur angewandt, wo auf eine Trennung von Citronen- und Isocitronensäure verzichtet werden konnte.

2) Säulenchromatographische Trennung

Zur säulenchromatographischen Trennung der in Frage kommenden Säuren sind verschiedene Verfahren in der Literatur empfohlen; dabei wird die Verteilungschromatographie (38) an inerten Trägern angewandt. Frohman u.M. (39)trennen die Säuren des Citronensäurezyklus an Silicagel, indem sie mit t-Amylalkohol/Chloroform eluieren. Den gleichen Träger verwenden auch andere Autoren (40,41); sie entwickeln jedoch mit Butanol/Chloroform wie als erster Isherwood (42), der allerdings noch keine Trennung von Citronen- und Isocitronensäure angibt. Um diese beiden Säuren so rein wie möglich voneinander zu scheiden, wurde der nahezu "ideale" Träger Celite gewählt (43,44) und mit Gradientenentwicklung gearbeitet (45-47).
Das Verfahren diente zur Analyse der Fermentversuche mit ^{14}C-Citronensäure und ebenfalls dazu , die bei diesen Ansätzen benutzte, enzymatisch gebildete Citronensäure zu gewinnen. Obwohl die Verteilung zeitraubend ist und viel Lösungsmittel beansprucht, musste sie nach Angaben der Literatur zweckmässiger erscheinen als die Trennung an Ionenaustauschersäulen (40,43).

3) Isotopenmessungen

Zur Bestimmung der Radioaktivität stand zunächst nur ein ß-Glockenzählrohr der Firma Frieseke & Hoepfner zur Verfügung (Fensterdicke ca.1,7 mg/cm^2). Man misst damit nach Götte (48) 0,5 - 1 % der von einem ^{14}C-Präparat ausgesandten schwachen ß-Strahlung. Die letzten Versuche konnten mit einem Methandurchflusszählrohr ("Flow-Counter" , FH 51) der gleichen Firma durchgeführt werden ; dieses Gerät ist wesentlich empfindlicher. Bei den damit

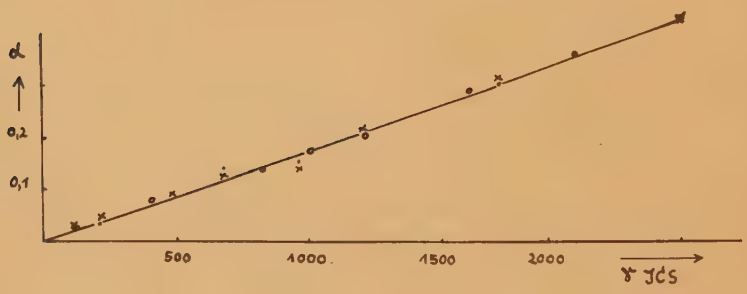
ausgeführten Messungen betrug der statistische Fehler (24)
jeweils ± 1 % (Impulsvorwahl). (78)
Es wurde entweder die Zählrohraktivität der freien organischen Säuren oder die ihrer Natriumsalze bestimmt. Zur Korrektur der Selbstabsorption (24,80) diente eine mit Natriumaconitat aufgenommene Umrechnungskurve.

4) Gehaltsbestimmungen

Für die Bestimmung von cis-Aconitsäure wurde die Extinktion ihres Salzes bei 240 mμ nach der Angabe von Racker (6) benutzt. Entweder wurde der Versuchsansatz während der enzymatischen Umsetzung direkt in Beckman-Küvetten analysiert oder eine mit verdünnter Schwefelsäure versetzte Probe wurde bei saurem p_H gemessen, wo cis-Aconitsäure schwächer absorbiert.

Um die Konzentration von Isocitronensäure zu bestimmen, wurde die Drehung ihres Molybdatkomplexes in saurer Lösung mit der grünen Quecksilberlinie nach Martius (vgl. 2,5,49-51) gemessen. Die Methode ist gegenüber Säuren- und Laugenzusatz empfindlich (52).
Da Fermentansatzproben verschieden hohen Citratgehalt aufweisen, wurde der von Martius (5) und von Krebs u. M. (50) beobachtete spezifische Einfluss der Citronensäure auf die Rotation berücksichtigt.
Fügte man Citrat in einem konstant bleibenden Überschuss zu unterschiedlichen Mengen der zu analysierenden Isocitronensäure, so wurden die Drehwerte α in dem erfassten Bereich linear abhängig von der Konzentration und daraus folgte eine innerhalb der Fehlergrenze der Methode konstante spezifische Drehung $[\alpha]$.

Darstellung der Drehwerte des Isocitronensäuremolybdatkomplexes in Abhängigkeit von der Isocitronensäurekonzentration



Es zeigte sich auch ein schwacher, negativer Einfluss von Aconitat auf die spezifische Rotation des Molybdatkomplexes, der sich durch Citrat teilweise kompensieren liess. Er ist aber nur dann zu berücksichtigen, wenn Aconitat in grossem Überschuss vorliegt, was aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist.

Einfluss von Aconitat auf die Drehung des Isocitronensäuremolybdatkomplexes

Isocitronensäure (mg)	Citronensäure (mg)	Aconitsäure (mg)	α_{5461}
3,36	96	174	0,55
3,36	96	-	0,59
6,72	96	174	1,05
6,72	96	-	1,12
0,8	-	392	0,10
0,8	234	-	0,15

III EXPERIMENTELLER TEIL

A) Ausgangsstoffe und Vorversuche

1) Acetylendikarbonester

Den Äthylester der Acetylendikarbonsäure erhielt Michael (53) mit 40 % Ausbeute durch Erhitzen der Komponenten mit konzentrierter Schwefelsäure, den Methylester Curtius (54) analog mit 33 % Ausbeute. Geringe Variation der Methoden brachte keine Verbesserung. +)
Fast die doppelte Ausbeute (bis zu 77% Reinprodukt, mittlere Ausbeute: 60 %) wurde jedoch bei Anwendung der Dialkylsulfite (56) erreicht. Erhitzte man z.B. 15 g Säure mit dem entsprechenden Sulfit und 0,2 ml konzentrierter, reiner Schwefelsäure 5,5 Std. unter Wasserausschluss am Rückfluss bei einer Ölbadtemperatur von 90-110° C, so konnte das Reaktionsgemisch nachher direkt fraktioniert werden. Die Darstellung auf diese Weise ist auch deshalb vorteilhafter als die nach Michael, weil auf das Ausschütteln der stark hautätzenden Ester verzichtet werden kann.
Wie Buchner (57) fand, geht Acetylendikarbonsäuredimethylester beim Erhitzen mit Schwefelsäure teilweise in Oxalsäureester über. Die Reinheit der Ester wurde daher sichergestellt, indem ausser den Siedepunkten auch die Brechungsindices bestimmt wurden.

+) Wenn nach Ruhemann und Beddow (55) die Komponenten mit Chlorwasserstoff als Katalysator umgesetzt wurden, so entstand Chlorfumarsäureester.

2) Essigsäure- und Malonsäureester

Die Carbonierungsreaktion nach Hauser u.M. (25a u. c) wurde in den Vorversuchen mit verschiedenen Essigsäureestern durchgeführt [+]. Der verwendete Propylester war Handelsprodukt, der Isopropylester wurde durch Erhitzen der wasserfreien Komponenten mit Chlorwasserstoff am Rückfluss erhalten (58). t-Butylacetat gewann ich durch Kochen des Alkohols mit Essigsäureanhydrid und Zinkstaub (27), wobei der Esteranteil nach dem Fraktionieren mit Sodalösung ausgeschüttelt, über Calciumchlorid getrocknet und erneut destilliert wurde.

t-Butylessigsäureester

	Siedepunkt (°C)		Brechungsindex	
Literatur (27)	Kp_{760}	97,8	n_D^{25}	1,3838
Gefunden	$Kp_{\sim 750}$	96,5-98	$n_D^{18,8}$	1,3870

Aus t-Butylessigester wurde Mono-t-butylmalonester mit einer mittleren Ausbeute von 71 % (bei Kohlendioxydüberschuss) hergestellt (Hauser: 60 %).
Der Halbester wurde wie üblich mit Diazomethanlösung verestert (25a, 59), Ausbeute,maximal: 96 % (Mittel aus 8 Ansätzen: 80 %), nach Destillation des Esters.

[+] Für Unterstützung bei der Bedienung der Apparatur, wo gleichzeitiges Einstellen verschiedener Hähne erforderlich war, danke ich den Herren Dipl.Chem. H.Teufel, Cand.Chem. H.G. Zachau und Dr.med. H. Simmer.

Siedepunkte und Brechungsindices von Methyl-t-butyl-malonester

mm Hg	Siedepunkt (°C)	T (°C)	Brechungsindex (n_D)
2	44 - 47	18	1,4168
		21	1,4147
7	63 - 65	22	1,4148
15	89 - 91	25	1,4126
20 (25a)	90,5-91,5		

3) Versuche zur Aconitsäuresynthese

Alkalische und auch saure Verseifung des nach Michael (23) erhaltenen Reaktionsproduktes aus Acetylendikarbonsäurediäthylester und Natriummalonsäurediäthylester lieferten unbefriedigende Ausbeuten. Besser verlief die Kondensation mit Magnesiummalonesterverbindungen (26). Allerdings musste, um die Magnesiumverbindung des t-Butylmethylesters darzustellen, der Umweg über Magnesiummethylat eingeschlagen werden (26a,c). Für den Dimethylester gibt auch Lund (26a) trägen Umsatz mit Magnesium an.
Die gelb gefärbte Magnesium-Tetrakarbonester-Verbindung, die sich bei Kondensation der beiden Äthylester bildete, liess sich zu fast 100 % mit Wasser fest aus dem Reaktionsgemisch abscheiden im Gegensatz zu der des Methylesters.

Darstellung von trans-Aconitsäure:

Die äquivalente Menge festen Magnesiummethylats wurde mit unverdünntem Malonsäure-t-butyl-methylester gemischt in einem Schliffkölbchen, das mit Anschützaufsatz, Rückflusskühler (Trockenrohr!) und Tropftrichter versehen war. Es bildete sich sofort die Malonester-Magnesiumverbindung, was an der Auflösung des Magnesiummethylats zu erkennen war. Erst danach wurde absolutes Benzol als Lösungsmittel zugesetzt und (gegebenenfalls unter Kühlung) 1,3 Äquivalente Acetylendicarbonsäuredimethylester, wobei stürmische Reaktion eintrat. Nach ein- bis zweistündigem Stehen wurde schwach erwärmt (Paraffinölbad: 60° C).
Der Ansatz konnte im Anschluss daran oder - ohne Ausbeuteverlust - am nächsten Tage aufgearbeitet werden. Dabei wurde das Lösungsmittel im Vacuum vertrieben, der Rückstand mit der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure zersetzt und mit Äther extrahiert. Nach Einengen des ausgewaschenen, getrockneten Ätherextraktes wurde langsam im Ölpumpenvacuum destilliert.
Zur Verseifung erhitzte man z.B. 2 g Ester mit 3 ml konzentrierter Salzsäure am Rückfluss (Badtemperatur 110 - 120° C) und ergänzte nach je einer Stunde die Salzsäure solange bis dadurch keine erneute Gasentwicklung hervorgerufen wurde (ca.6 Std.).

Äquivalentgewichtsbestimmung, Aconitsäure, $C_6H_6O_6$ (174,11)

Einwaage (mg)	93,4 +)	83,3 ++)
Ber. Äg.	58,03	58,03
Gef. Äg.	59,9	58,1

+) Aconitsäure, einmal aus Salzsäure umkristallisiert,
++) die gleiche Säure nach weiterer Reinigung aus Äther / Petroläther.

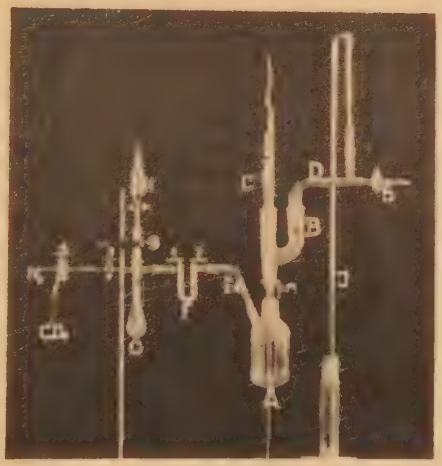
Analyse, Aconitsäure
(Bernhardt)

$C_6H_6O_6$ (174,11) Ber. C 41,39 H 3,47
Gef. C 41,64 H 3,60

B) Synthese radioaktiver Aconitsäure

1) Carbonierungsreaktion und Veresterung

Für die Isotopensynthese wurde die abgebildete Apparatur benutzt.



A Reaktionskolben
B Anschützaufsatz
C KPG-Rührer
D Ableitungsrohr
E Einleitungsrohr
F Phosphorpentoxyd-trockenrohr
G $^{14}CO_2$-Entwicklungskölbchen
H Tropftrichter für Perchlorsäure
J Quecksilberventil
1 - 5 Schliffhähne

Vor Beginn eines Versuches wurde die Anordnung auf Vacuumdichtigkeit geprüft und bei aufgesetzten Phosphorpentoxydrohren unter Erhitzen getrocknet. Das Einleitungsrohr E mit den anschliessenden Teilen bis zum

Hahn 3 wurde erst für die eigentliche Carbonierung eingesetzt, vorher befand sich dort das Zuleitungsrohr für den Bombenammoniak und zwischen die Hähne 3 und 4 waren ein Quecksilberventil, drei Trockentürme und ein Blasenzähler eingeschaltet.

War die Natriumverbindung des Esters hergestellt (25) , so wurde die ätherische Lösung bei geschlossenen Hähnen 3 und 5 unter Rühren gekühlt. Dabei stellte sich im Reaktionsraum ein Unterdruck ein, der von dem Quecksilbermanometer J angezeigt wurde.Dann wurde das Bariumkarbonat vorsichtig mit Perchlorsäure zersetzt. Weil das Einleitungsrohr (unten erweitert) nur wenig oberhalb des Kolbenbodens mündete, konnte sich das einströmende Gas sofort mit dem Esteranion umsetzen; der Druck stieg daher nur langsam an.Nach Ende der Gasentwicklung in G wurde von 4 aus noch kurz mit inaktivem Kohlendioxyd und mit Stickstoff nachgespült. Die Aufarbeitung erfolgte weiter nach Hauser u.M. . Die Ausbeute an Halbester wurde durch Titration eines aliquoten Teiles der Ätherlösung bestimmt (25).

Für die Isotopensynthese standen 3 mC $Ba^{14}CO_3$ (0,47 g) zur Verfügung. Im ersten Carbonierungsansatz wurden nur 129 mg (0,65 mMol , 0,82 mC) auf 150 mMol t-Butylacetat eingesetzt.Nach Entwicklung des markierten Kohlendioxyds wurde inaktives im Überschuss nachgespült, wobei mit quantitativer Umsetzung des zunächst eingeleiteten aktiven Gases gerechnet wurde. Der isolierte Malonester mit einer Zählrohraktivität von 400c/min/mg war jedoch zu stark verdünnt; im Hauptversuch wurde daher mit Unterschuss an Gesamtgas gearbeitet. Zweiter Isotopenansatz:

ca. 150	ml	flüssiger Ammoniak	
" 110	mMol	Natrium	(2,5g)
0,11	mMol	Ferrinitrat ($Fe(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$)	(35 mg)
55	"	Essigsäure-t-Butylester (6,42g/15-20 ml abs.Äther)	
9,1	mMol	$Ba^{14}CO_3$ (1,8 g, ca. 80 c/m/mg)	
1,6	"	" (0,33g, 2,1 mc); 40 %ige $HClO_4$	
ca. 20	"	CO_2 aus der Bombe	

Übersicht über die chemische Ausbeute an Malonsäureester bei dem letzten Vorversuch und den beiden Isotopenansätzen

	Vorversuch	Isotopenansatz I	Isotopenansatz II
Eingesetzter t-Butylester	150 mMol	150 mMol	55 mMol
Eingesetztes Kohlendioxyd (mMol)	15 als $BaCO_3$ ausserdem: CO_2	Von 15 $BaCO_3$ 0,65 aktiv ausserdem: CO_2	9,1 $Ba^{14}CO_3$ +) (schw.aktiv) u. 1,6 (2,1mC) ausserdem: ca. 20 CO_2
Halbesterausbeute:(mMol), %,bez.auf den Essigester	119 79,5	87,4 58,2	30 -
Diesterausbeute: (g), %,bez.auf den Halbester++)	18,1 87,5	12,2 81	3,5 67

+) Dieses Karbonat war bei Aufarbeitung der ersten Isotopensynthese angefallen (Zählrohraktivität:80 c/m/mg).

++) Die Halbester-Ausbeute ist dabei mit 100 % angenommen, um wie bei Berechnung der Isotopenausbeute das umgesetzte Kohlendioxyd zugrundezulegen. Diese Annahme, dass sich annähernd 100 % von dem aus $BaCO_3$ entwickelten CO_2 umgesetzt hätten, wird gestützt durch die gefundene Isotopenausbeute, die beim Ansatz II höher liegt als die chemische Ausbeute (67 % : 71 %).

Isotopenausbeute bis zum Malonsäurediester

Einsatz	Isotopenansatz I	Isotopenansatz II
1. $Ba^{14}CO_3$ (g)	0,129	0,33 u. 1,88
2. Akt.Ester	-	ca. 0,2
Absol.Gesamtaktivität:(c/m), (mC)	$182\ 10^7$ 0,82	$470 \cdot 10^7$ 2,12 (2,1+0,013+ 0,007)
Ausbeute		
Diester (g)	14 g	3,7 g
Diester, relat. Aktiv.(c/m/mg) +)	400	4 500
Diester, absol. Aktiv. (c/m)++)	$112 \cdot 10^7$	$333 \cdot 10^7$
Isotopenausbeute (%)	61,5	71

+) Die Messungen wurden freundlicher Weise von Herrn Professor Martius in Würzburg vorgenommen, da mir in Tübingen kein ß-Zählrohr zur Verfügung stand.

++) Die absolute Aktivität wurde unter der üblichen Voraussetzung berechnet, dass von dem Zählrohr etwa 1% der Strahlung eines festen ^{14}C-Präparates erfasst wird (48). Für Selbstabsorption in der flüssigen Verbindung wurden 50 % Verlust eingesetzt.

2) Trans-Aconitsäure

Die Kondensationsreaktion wurde in Ansätzen von je etwa 30 mMol aktiven Diesters durchgeführt (vgl. S.16). Zur Reinigung der Aconitsäure wurde nach der Verseifung die Salzsäure im Vacuum vertrieben, der Rückstand unter Zusatz von Tierkohle und Trägersubstanz in verdünnter Salzsäure gelöst und mit konzentrierter Säure ausgefällt. Danach wurde aus Äther/Petroläther umkristallisiert (auf 1g Säure 100 ml Äther, ausgefällt mit Petroläther, Siedepunkt: 70-80°C). Diese mit grossen Verlusten (über 15 %) verbundenen Umkristallisationen waren erforderlich, wenn man eine reine Säure erhalten wollte, was bei einer Synthese isotop markierter Verbindungen unerlässlich ist.

Zusammenstellung der Chemischen Ausbeuten für Aconitsäure

	Vorversuch	Ansatz I	Ansatz II
a)			
Gef.,(mMol)	155	28,6	25,6
Ber.,(g)	2,61	5,0	4,46
Gef., (g)	1,38	2,93	2,97
Gef.,(% d.Theorie)	53	53	58
b)			
(%)	46,4	47,3	39

a): Ausb. an reiner Aconitsäure, bez. auf d. eingesetzten Diester. b): Gesamtausbeute, bez. auf 100 % Umsatz des aktiven $C\bar{O}_2$ (vgl. S.19, Anm.: $^{++}$).

3) Cis-Aconitsäure

Zur Isolierung der cis-Säure (60) wurden z.B.112 mg reines, markiertes cis-Anhydrid (29 a) mit 0,01 ml Wasser in wenig reinem Essigester gelöst und die nach viertägigem Stehen auskristallisierte Säure abgetrennt.

Schmelzpunkte: F_p(°C)	Literatur (29 a)	Gefunden
cis-Aconitsäureanhydrid	78,5	76,5 - 77
cis-Aconitsäure	125	125

C) Gewinnung optisch aktiver Isocitronensäure

Während meiner Diplomarbeit hatte ich reine, nach einer modifizierten Fittigschen Synthese (35) gewonnene Trichlormethylparaconsäure - die schon erwähnte Vorstufe der Isocitronensäure - über die Brucinsalze aufgespalten. Von diesen Versuchen her standen an unvollständig gespaltener Paraconsäure 14 g mit $[\alpha]_{5461}^{18} = + 33^{\circ}$ zur Verfügung (Drehwinkel der reinen Antipoden: $[\alpha]_{5461}^{18} = \pm 41,2^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$, Äther, ca. 6 %). Die Säure wurde mit Natronlauge verseift (60) und nach Salzsäurezusatz und Filtration wurde im Vacuum eingeengt. Der mit Toluol entwässerte Rest (61) liess sich im Exsikkator vollkommen lactonisieren. Der Rückstand wurde dann mit Essigester/Chloroform ausgezogen und das Lacton mit Toluol gefällt. Der Hauptanteil der gewonnenen Substanz bestand zu 30,5 % aus racemischem Lacton und zu 69,5 % aus der natürlichen Form der Lactoisocitronensäure (Rotation des Molybdatkomplexes nach Martius, vgl. 2,5,49-51).

Drehwerte der Molybdatkomplexe von Isocitronensäure (ICS)

Ausgangsmaterial +)	ICS (mg)	α_{5461}	$[\alpha]_{5461}$
Dimethylesterlacton der (+) ICS	2	$- 0,35_5^{\circ}$	$- 875^{\circ}$
	4	$- 0,70^{\circ}$	$- 886^{\circ}$
Synthetische ICS	$2,94_5$	$- 0,36^{\circ}$	$- 612^{\circ}$ (69,5% von $- 881^{\circ}$)

+) Lösungen der natürlichen Isocitronensäure drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, die ihres Molybdatkomplexes und ihres Lactons drehen sie nach links.

D) Trennungsverfahren und Analysen

1) Papierchromatographie

Bei verschiedenen papierchromatographischen Verfahren wurde geprüft, ob sie sich zur Trennung der 3 Substrate der Aconitase eignen würden (62). Als Papiere dienten dabei Whatman I, Schleicher und Schüll 2045 b und versuchsweise Whatman IV.
Die Anwendung wassergesättigter Gemische von einerseits Ammoniak mit Äthanol oder Isopropanol und andererseits Essigsäure mit Aceton oder Toluol (63) brachten keine Verbesserung gegenüber der von Martius u.M.(37) modifizierten Methode von Lugg und Overell (64). Dass hierbei die Flecke von Citronen- und Isocitronensäure im gewünschten Konzentrationsbereich verschmolzen, liess sich auch durch absteigende Technik oder Temperaturerniedrigung (0°C) nicht vermeiden. Änderung des Verhältnisses Butanol: Chloroform (0-80 % $CHCl_3$ im Gemisch), Zusatz von Borsäure zur Analysensubstanz oder Imprägnierung des Papiers mit Silicagel (65a) oder Stärke (65b) führten ebensowenig zu brauchbarer Trennung wie die Anwendung von ringchromatographischen Methoden (66). Weitere in der Literatur zur papierchromatographischen Analyse von Poly- oder Oxykarbonsäuren angegebenen Lösungsmittelgemische wurden nicht untersucht, da es sich teilweise um nichtflüchtige Substanzen handelte und die mitgeteilten R_f - Werte keine bessere Isolierung versprachen.

Gefundene R_f - Werte

Säure +)	ICS	CS	ICS - lacton	AS	T
R_f - Wert	0,14	0,19	0,39	0,38	0,67

Verteilungsmittel: 60 % Butanol/Chloroform, wassergesättigt; Gasraum : 40 % SO_2; Zimmertemperatur.

+) Abkürzungen, vgl. S.46 ; T = trans-Aconitsäure

Im Vorversuch wurde die praktisch quantitative Wiedergewinnung einer eingesetzten Säuremenge bestätigt; ausserdem wurde die Trennschärfe der Methode geprüft nach Zusatz markierter trans-Aconitsäure (T^+) zum Gemisch.

Vorversuch mit markierter trans-Aconitsäure (T^+)

	CS (mg)	ICS (mg)	T^+ (mg)	T^+ (%)	Zählrohraktivität (c/m i.d. Probe) CS+ICS	L	T^+
a	0,6	-	0,615	52	0	-	200
b	4,6	0,375	0,250	4,8	0	-	140
c					nach Extraktion:		
	6,4	6,34	0,22	1,6	0	1	3350

a und b = Punktchromatographien, c = Streifenchromatographie

L = Isocitronensäurelacton

Für die Papierchromatographie wurden aus den enteiweissten Fermentansätzen die drei Säuren bei p_H 6 als Quecksilber-I-salze gefällt.(1 ml schwach salpetersaure gesättigte Merkuronitratlösung auf 2,5 mg Säuren, die noch in 0,05 %iger Lösung vorliegen können). Nach Abzentrifugieren wurden die Salze in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff umgesetzt. Die Lösung der freien Säuren wurde schliesslich eingeengt und auf der Startlinie als Streifen aufgetragen. Nach der Trennung wurden die Substanzen nach Dent (68) aus dem Papier herausgelöst . Die Radioaktivität der Proben wurde in V2A - Schälchen gemessen.

2) Verteilungschromatographie mit Celite

Die Celite - Säule (Celite 545[+]) wurde nach Swim und Krampitz (44) hergestellt mit nach Weygand (69) gereinigtem Chloroform. Das n-Butanol wurde vor Gebrauch fraktioniert. Alle Eluierungsgemische wurden zunächst mit 0,2 n Schwefelsäure gesättigt.

Fraktionensammler mit Auffang- und Schaltgefäss

Für das Gradientenverfahren wurden die Angaben von Hurlbert u.M. (47) benutzt.

Vorrats-, Mischgefäss und Säule waren durch Kapillarrohr verbunden.
Das Eluat wurde in einem Glasgefäss aufgefangen, das sich nach Art eines Soxhletapparates in die Gläser des Fraktionensammlers entleerte. Das Auffangrohr war über einen Heber so mit einem kleinen Schaltgefäss verbunden, dass die leitende Flüssigkeit im Schaltgefäss den Stromkreis zwischen 2 Platinelektroden schloss, sobald

[+] Der Celite wurde freundlicher Weise von der Firma Lehmann & Voss & Co., Hamburg, kostenlos zur Verfügung gestellt.

eine bestimmte Flüssigkeitshöhe im Auffangrohr erreicht war.++)

Für die Durchlaufgeschwindigkeit wurde als Optimum 0,5 ml pro Minute gefunden (Rohrdurchmesser: 1,8 cm ; Füllhöhe: 40 cm, 70 g Celite). Es liessen sich 40 - 50 mg Gesamtsäuren in einer Säule trennen, wenn etwa 10 % davon als Aconitsäure, 30 % als Isocitronen- und 60 % als Citronensäure vorlagen. Die Aconitsäurekonzentration wurde niedrig gehalten, weil ein höherer Wert die Trennung von CS und ICS verschlechterte.+)

Zur Entwicklung wurde nach Durchlauf von 100 - 200 ml Chloroform die Vorratsflasche nacheinander mit 600 ml 25 %-, 900 ml 35 %- und 700 ml 45 %igem Butanol-Chloroform gefüllt, wobei der Mischkolben anfangs 300 ml Chloroform enthalten hatte.

Die graphischen Darstellungen zeigen einige Kontrollversuche, denen Titrationen mit 0,02 n NaOH zugrundeliegen. ICS wurde ausserdem qualitativ und quantitativ über ihren Molybdatkomplex nachgewiesen und auf CS wurde qualitativ (Farbreaktion mit Vanillin) geprüft, um die Maxima den verschiedenen Säuren zuordnen zu können.

Der mit fortschreitender Entwicklung höher werdende Leerwert ist auf Beimischung von Schwefelsäure zurückzuführen (70 u.71).

Bei einigen Trennungen wurde der "Leerwert" bei der Titration in einzelnen Proben im Bereich der Fraktionen Nr. 20 - 40 höher als üblich gefunden. Bedingt war dieses vermutlich durch saure Ester, die sich während der Chromatographie gebildet hatten (42) ; denn dieser erhöhte "Leerwert" liess sich durch Herabsetzen der Schwefelsäurekonzentration in der Probe erniedrigen.

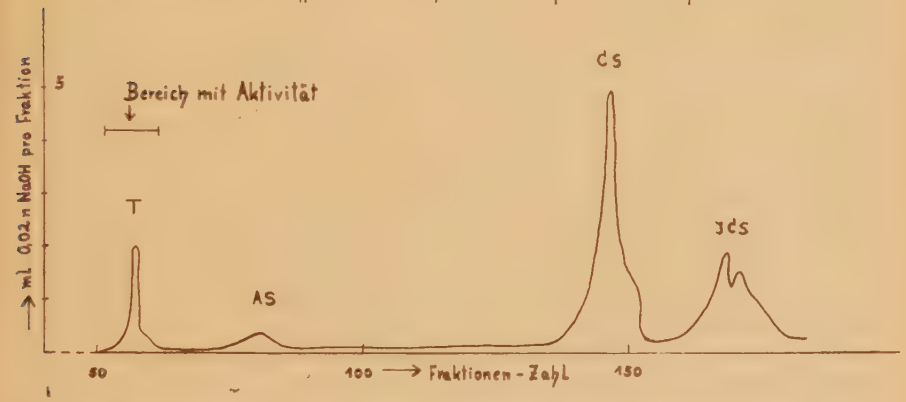
+) Abkürzungen, vgl. Formelblatt

++) Flüssigkeitsmenge jeweils ca.12 ml.

Darstellung I

Titrationswerte

	T^+	AS	CS	ICS
ml gef.	4,1	1,0	22,9	12,0
ml ber.	4,0	0,9	22,7	12,0
mg Substanz[+)]	4,35	1,1	28,5	13,6



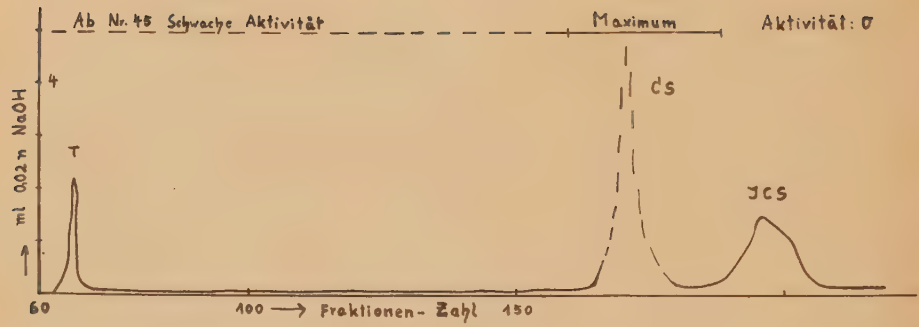
In der ICS-Fraktion wurde innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode der nach der Ausgangslösung zu erwartende Drehwert gemessen:
Ausgangslösung (1/10) : = - 0,22° (Molybdatkomplex)
ICS-Fraktion (1/10) : = - 0,19° (").
Das als trans-Aconitsäure eingesetzte Leitisotop wurde hierbei ausschliesslich in der gegenüber der Titration etwas verbreiterten trans-Aconitsäurefraktion gefunden.

Darstellung II

Titrationswerte

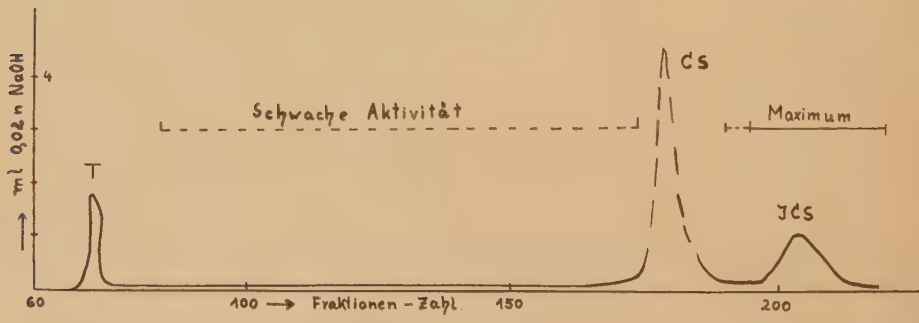
	T	CS^+	ICS
ml gef.	4,5	18,5	11,2
ml ber.	$4,5_6$	18,6	11,4

+) T^+ = trans-Aconitsäure, markiert, T = trans-Aconitsäure



Die Aktivität der markierten Citronensäure wurde nicht nur in der CS-Fraktion gefunden, sondern war zu etwa 1 % auf die vorhergehenden Eluate verschmiert (Annäherungsberechnung), wobei weniger als 0,1 % auf die Aconitsäure entfielen, während keinerlei Zählrohraktivität in der ICS erschien.

Darstellung III



Es wurde neben inaktiver CS und Aconitsäure markierte ICS eingesetzt (22,2 mg Natriumisocitrat mit einer Zählrohraktivität von 300 c/m/Gesamtprobe). Ir ier isolierten ICS (24,9 mg Natriumsalz) wurden davon 97 % wieder-

gefunden (290 c/m/Gesamtmenge). Im Gegensatz zum Versuch mit markierter CS zeigten erst die auf trans-Aconitsäure folgenden Fraktionen Zählrohraktivität und in der isolierten CS war keine Aktivität nachweisbar.

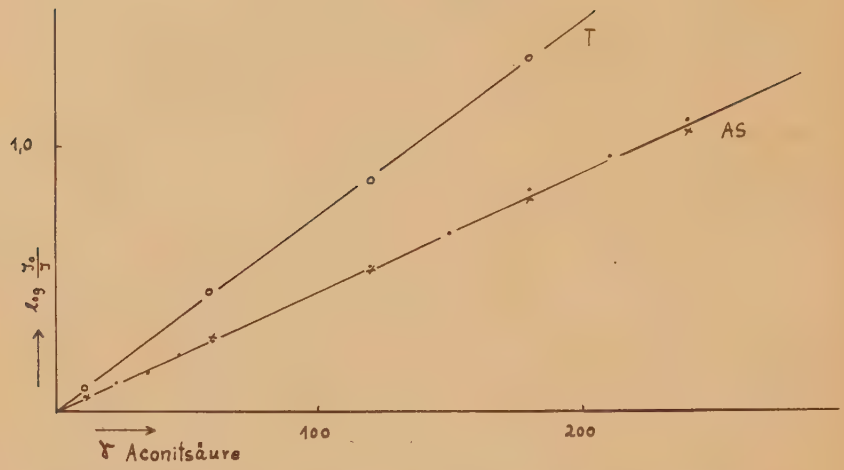
Wie aus diesen Kontrollversuchen hervorgeht, war eine kritische Beurteilung der Chromatogramme angesichts der Aktivitätsverschleppung notwendig, da neben hohen auch kleine Zählrohrwerte quantitativ bestimmt werden mussten.

Das bei Isocitronensäure auftretende verwaschene Maximum ist als Folge des Uberganges der Säure in die Lactonform zu deuten (vgl. 40).

3) Bestimmung von Aconit- und Isocitronensäure

Wenn zur Aconitsäurebestimmung der Fermentansatz im Beckman-Photometer (3ml Küvetten, 1cm Lichtweg) direkt getestet wurde, musste eine hohe Leerwertsextinktion in Kauf genommen werden. Wurde Wasser als Kontrollösung verwandt, so musste der Aconitatgehalt bei weniger als 60 γ Aconitsäure pro ml liegen, um noch gemessen werden zu können (die Extinktion durch das Substrat wurde gesondert erfasst ebenso wie diejenige durch das Enzym). Um die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung zu erhöhen, musste die Empfindlichkeit herabgesetzt werden. Dazu wurde anstelle von Wasser eine Standardaconitatlösung als Kontrollösung eingesetzt; die Aconitsäurekonzentration in der Probe konnte dann etwa 60 γ /ml betragen. Bei Ansätzen mit der 10 - 20fachen Aconitatkonzentration, wo eine Direktmessung nicht möglich war, wurde die Reaktion in einem aliquoten Teil des Versuches mit verdünnter Schwefelsäure gestoppt. Die graphische Darstellung gibt zwei analog aufgenommene Eichkurven für cis-Aconitsäure und eine entsprechende für trans-Aconitsäure wieder (Verdünnung dabei: 0,5 ml Ansatz + 7,0 ml Schwefelsäure 1 : 465).

Aconitsäure - Eichkurven



Um eine Kontrolle über eine etwaige Umlagerung während des Fermentversuches zu haben, wurde cis-Aconitatlösung bei p_H 7,4 ohne und nach Erwärmung analysiert. Die Tabelle zeigt, dass bei kurzzeitiger Temperaturerhöhung (vgl.29b,72,60) keine über die Fehlerbreite hinausgehende Abweichung der Extinktionswerte voneinander festzustellen war, ebenfalls konnten Bestimmungslösungen über Nacht bei 0° C aufbewahrt werden.
Die Genauigkeit der Bestimmung betrug bestenfalls ± 5 γ cis-Aconitsäure.

Tabelle

cis-Aconitsäure (γ)	0'	60' 25°	60' 37°	Extinktions-zuwachs in %
60	0,269	0,270	0,275	0,2
120	0,557	0,555	0,555	-
180	0,840	0,850	0,850	1,2

Für die Isocitratbestimmungen wurden nach Martius (2,5) 5,0 ml zu analysierende Lösung mit 0,5 ml Eisessig, danach mit 4,5 ml kalter, bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniummolybdatlösung versetzt. Es wurde anschliessend sofort der Drehwinkel gemessen, wenn nötig, nach Filtration durch Kieselgurpapier (vgl. auch 49-51). Die Endprobe (10 ml) war 0,1 - 0,2 m an Citrat (eingestellt durch Zusatz von festem Natriumcitrat zur essigsauren Analysenlösung oder der entsprechenden Menge 0,5 m Citratlösung zur angesäuerten Ansatzprobe).
Auf Grund des Ablesefehlers von etwa $\pm$ 0,02° für α betrug die Genauigkeit der Bestimmung bestenfalls 50 - 100 γ Isocitronensäure.

E) Fermentversuche

Aconitase wurde in allen Fällen nach Dickman und Cloutier (73) gereinigt. Sie ist dann bei -20° etwa 10 Tage haltbar. Um die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmungen zu erhöhen, wurden die Versuche ohne aktivierende Reagentien ausgeführt und auch ohne Puffer, da sich das p_H der Lösung während des Versuches praktisch nicht änderte. Die Aktivität der verschiedenen Enzympräparate wurde in Standardansätzen mit 0,01 m cis-Aconitat oder 0,2 m Citrat als Substrat verglichen. Bei den Isotopenansätzen war das Ferment in allen Fällen mit Substrat gesättigt.

Fermentversuche mit ^{14}C-cis-Aconitsäure

Für jeden Ansatz mit ^{14}C-Aconitsäure waren aus verschiedenen Vorversuchen, die unter analogen Bedingungen über längere Zeit verfolgt worden waren, die Umsatzwerte vorausberechnet worden. Ausserdem wurde während des Versuches und zu Ende die Aconitsäure analytisch bestimmt.

Als Substrate lagen ^{14}C-Aconitsäure und eine im Überschuss dazu stehende Menge ICS[+)] vor. Die Versuche werden auf Seite 37 näher besprochen. - Der Ansatz K mit einer äusserst niedrigen Fermentkonzentration diente als Kontrolle des Analysenverfahrens.

Versuchsbedingungen der Enzymansätze

	Ansatz I	Ansatz II	K
Reaktionstemperatur	25°C	25°C	19°C
Substrat	(+)ICS	Racemat der ICS	(+)ICS
Molare Konzentration an einges. (+)ICS	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-1}$ ++)	$5 \cdot 10^{-3}$
Enzym (ml/mMol Substrat)	0,066	0,256	0,004
Vorgelegte AS^{+}(Mol%)	0,82	1,2	2,18
Reaktionszeiten (min)	11,5	1;2;3,5;30;90	6;40
AS,Gesamt-Konz.nach der Reaktion (Mol%)	ca.8,8	2,4 - 18,85	

+) Abkürzungen,vgl. Formelblatt

++) In diesem Falle ist die Konzentration an racemischer Säure, da nur solche eingesetzt wurde, doppelt so hoch wie die für (+) ICS angegebene molare Konzentration.

Versuchsergebnisse der Ansätze mit ^{14}C-cis-Aconitsäure

Ansatz	AS^{+} vorgel. (Mol%)	Zeiten (min)	AS Zuwachs (Mol%)	Isotopenverteilung "A" : "O" +) (c/m)	(%)
I	0,82	11,5	ca.8	143 : 90	59 : 41
II	1,2	1	1,2	219 : 70 ++)	71 : 29
		2	2,1	131 : 31	91 : 19
		3,5	2,4	140 : 20	87 : 13
		5	3,0	nicht bestimmt	
		30	12,3	70 : 74	46 : 54
		90	17,6	47 : 146	23 : 77
K	2,18	6		133 : 4	97 : 3
		40		136 : 3	98 : 2

Der Isotopengehalt der zu vergleichenden Säuren wurde bei gleichen Schichtdicken der Proben im ß - Fensterzählrohr gemessen (Leerwert : 20 c/m). Aus der aufgeführten Zählrohraktivität (c/m) wurden die angegebenen relativen Aktivitäten ermittelt (%).

+) "A" : "O" = Relative Aktivität der Aconitsäure : Relative Aktivität der Oxysäuren

++) Bei diesem Wert war für die Analyse 2,5mal so viel Substanz wie bei den folgenden eingesetzt worden.

Fermentversuche mit ^{14}C-Citronensäure

Inwieweit eine zeitliche Verfolgung des Isotopenaustausches im chemischen Gleichgewicht Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus bei der Aconitase-Reaktion zulässt, wird auf Seite 40/41 erörtert.

Die für die Gleichgewichtsversuche verwendete radioaktive Citronensäure wurde erhalten, indem markierte cis-Aconitsäure bis zum enzymatischen Gleichgewicht (ca. 89 % CS) mit Aconitase umgesetzt wurde. Das Gemisch wurde, wie schon erwähnt, an Celite getrennt. Das gewonnene Natriumcitrat erwies sich papierchromatographisch als frei von Aconit- und Isocitronensäure.

Für die Konzentrationen von CS, ICS und AS im enzymatischen Gleichgewicht der Aconitase sind von verschiedenen Autoren die in der Übersicht aufgeführten Werte angegeben (Martius u. Leonhardt (5), Freksa u. Martius (11), Krebs u.Eggleston (50), Eggleston u.Krebs (51), Hargreaves u.M. (74),Krebs(76),ausserdem:Martius u. Lynen(49),Ochoa(75)).

Übersicht

Zitat	Versuchsbedingungen	% CS	% ICS	% AS
5 (1943)	37°C p_H 7,4 Phosphatpuffer, Enzym aus Rindsleber	89,2	7,7	3,1
50(1943) und 51 (1949)	38°C p_H 6,8 Phosphatpuffer, Enzym aus Leber oder Muskel	89,1	6,6	4,3
11 (1951)	Folgerungen aus der Reaktionskinetik	88	7	5
74 (1951)	38 - 40°C , Enzym aus Herzmuskel	88,9 ± 0,55%	-	-
76 (1953)	25°C p_H7,4 $NaHCO_3$-CO_2-Puffer, Enzym aus Schafsherz	90,9	6,2	2,9

Wie die Übersicht zeigt, schwanken die angegebenen Werte, was nicht verwunderlich ist, da sie unter verschiedenen Reaktionsbedingungen gemessen worden sind. Allerdings ist zu berücksichtigen: Die Analysenmethoden sind überfordert, wenn man zwischen Bruchteilen von Molprozenten mit Sicherheit unterscheiden will.

Um sicher zu sein, dass bei meinen eigenen Versuchsbedingungen (25°C, pufferfreie Lösung bei p_H 7,4 , Enzym aus Schweineherz) die gewählte Zusammensetzung auch wirklich dem Gleichgewichtszustand entsprach, erschien es mir nicht erlaubt, eine Literaturangabe ungeprüft zu übernehmen. Daher machte ich verschiedene Vorversuche mit unterschiedlichen Substratzusammensetzungen (inner- und ausserhalb des angegebenen Gleichgewichtsbereiches), um daraus die geeigneten Mengenverhältnisse mit der im Rahmen der Bestimmungsmethoden erreichbaren Genauigkeit zu ermitteln.+) Analytisch geprüft wurde bei diesen Ansätzen die eventuelle Änderung von ICS- und AS-Gehalt unter Fermenteinfluss. Dementsprechend wurden die Bedingungen für den Hauptversuch mit markierter CS ausgewählt; aber vor dem Enzymzusatz zu der Gesamtlösung wurden ihr drei Proben entnommen,und mit ihnen zur Sicherung nochmals Vorversuche angestellt, wobei allerdings nur die AS-Konzentration bestimmt werden konnte.(Eine ICS-Messung hätte zu viel Substanz erfordert.)

Für den Isotopenansatz I wurde eine schwächer aktive CS verwendet; zur Bestimmung der Radioaktivität diente ein ß-Glockenzählrohr. Beim Ansatz II - mit stärker markierter CS - konnten kürzere Reaktionszeiten gewählt werden;

+) Wie die papierchromatographische Analyse zeigte, war ein Teil der von mir für die Gleichgewichtsversuche verwendeten cis-Aconitsäure (nach mehrmonatigem Stehen) gering mit trans-Aconitsäure verunreinigt, die gemachten Konzentrationsangaben sind daher nicht ganz exakt, was aber die Genauigkeit der Gleichgewichtseinstellung nicht beeinflusst hat.

aber die Aconitsäurefraktionen mussten wegen der schon erwähnten Aktivitätsverschleppung rechromatographiert werden. Für die Isotopenanalyse benutzte ich hierbei ein Methandurchflusszählrohr (Leerwert: ca.20 c/m ; Präparateschälchen aus Aluminium).

Versuchsbedingungen der Gleichgewichtsansätze

	Ansatz I	Ansatz II
Substratkonzentration	$1 \cdot 10^{-1}$ m	$8 \cdot 10^{-2}$ m
Fermentgehalt (ml/mMol Substrat)	0,15	0,195
Temperatur (°C)	25	25
Zusammensetzung: CS^+: ICS : AS (Mol %)	89,2:6,2:4,4	88,3:7,6:4,2
Reaktionszeiten (min)	15;30;60	4,5;9;16;20;30
Zählrohraktivität des einges. Natriumcitrats, pro mMol	37 000 c/m	8 000 000 c/m

Versuchsergebnisse +)

Ansatz	Reaktionsz. (min)	Zählrohraktivitäten "A" = $\frac{[As^+]}{[As^+]+[As]} \cdot 100$	"I" = $\frac{[ICS^+]}{[ICS^+]+[ICS]} \cdot 100$	"A":"I"
II a	9	20	8,4	2,4:1
II b	16	32	12,5	2,6:1
I	60	47	15,7	3 : 1

+) Es wurden nur die Ansatzproben analysiert, die sich am besten für eine Auswertung eigneten.

IV BESPRECHUNG DER FERMENT-VERSUCHE

A) Versuche mit ^{14}C-Aconitsäure

Um zu prüfen, ob enzymatisch ein direkter Übergang zwischen Isocitronensäure (ICS) [+)] und Citronensäure (CS) stattfindet, liess ich auf Isocitronensäure, der 0,8 - 1,2 Mol% markierter Aconitsäure (AS^+) zugesetzt waren, Aconitase einwirken. Diese Versuche wurden in der Hoffnung unternommen, dann bei nur kurzen Reaktionszeiten in der CS/ICS - Fraktion wenig oder kein radioaktives Material zu finden, falls eine direkte Reaktion ICS--CS stattfände.

Da mit steigender Konzentration an AS die Bildung von CS aus dieser Säure ebenfalls zunimmt, musste der Ansatz bei möglichst niedrigen Aconitsäurewerten unterbrochen werden, denn, wenn man von ICS ausgeht, steigt die Menge der sich bildenden AS anfangs auf das etwa dreifache ihres Gleichgewichtswertes an, der bei 4 % liegt (vgl. Martius u.M.: 5,49,11).

Entsteht andererseits CS zwangsläufig nur über AS, so sollte man in der CS/ICS - Fraktion sofort eine entsprechende Aktivität messen können.

Die Hoffnung, auf Grund eines derartigen Versuches eine Entscheidung zugunsten einer der beiden Reaktionswege treffen zu können, wurde jedoch nicht bestätigt.

Schon nach kurzer Reaktionszeit wurden in der Oxysäurefraktion etwa 20 % der isolierten Aktivität bestimmt. Dieses Ergebnis ist nun aber deswegen nicht eindeutig, weil es die Möglichkeit nicht ausschliesst, dass CS

[+)] Abkürzungen, vgl. Formelblatt

sich teils über AS teils aber auch direkt aus ICS gebildet habe. Bei Verwendung eines empfindlicheren Isotopennachweisgerätes oder noch höherer spezifischer Aktivität der AS, womit noch kürzere Reaktionszeiten und eine geringere AS^+-Anfangskonzentration möglich gewesen wären, hätten sich zwar die Ergebnisse noch verfeinern lassen; doch geht aus experimentellen Bestimmungen der Michaeliskonstanten, die inzwischen veröffentlicht worden sind (10,14), hervor, dass die Aconitase eine vielfach höhere Affinität zur Aconitsäure hat als zu einer der Oxysäuren. Die enzymatische Hydratation dieser Säure ist also stark bevorzugt gegenüber den Umsetzungen der beiden anderen Säuren. Daher halte ich es für nicht wahrscheinlich, dass sich ,selbst bei noch günstigeren Bedingungen,ein eindeutiges Ergebnis erzielen liesse.

Übersicht über die von Racker (6), Tomizawa (10) und Morrison[+)] bestimmten Werte für die Michaeliskonstanten der Aconitase

	Michaeliskonstanten (K_m in Mol/l)		
	AS	CS	ICS
Racker	-	$11 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$
Tomizawa	$0{,}9 \cdot 10^{-4}$ $1 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$	$3{,}2 \cdot 10^{-4}$
Morrison	$1{,}2\ 10^{-4}$	$36 \cdot 10^{-4}$	$4{,}8 \cdot 10^{-4}$

Die angeführte Übersicht über die Michaeliskonstanten soll darauf hinweisen, wie schwierig deren Bestimmung offenbar ist und wie grosse Vorsicht bei ihrer Verwendung geboten ist; denn die von verschiedenen Autoren

+) Angeführt bei Peters (14)

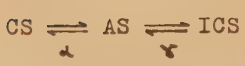
unabhängig voneinander ermittelten Werte stimmen nicht so gut überein wie sie es sollten. Mag dies zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass Enzyme aus verschiedenen Ausgangsmaterialien benutzt worden sind, so fällt doch vor allem der Mangel an Empfindlichkeit der Analysenmethoden ins Gewicht. Dies gilt für die Bestimmung der Michaeliskonstanten wie auch für die Bestimmung der Substratkonzentrationen im enzymatischen Gleichgewicht und auch für diejenige der Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Fermentreaktionen, die von verschiedenen Autoren angegeben sind. An eigenen Messungen der Gleichgewichtskonzentrationen und der Anfangsgeschwindigkeiten kam das ebenfalls zum Ausdruck. Als Beispiel sei noch einmal die von Krebs und Holzach (12) beobachtete Induktionsperiode bei der Bildung von ICS aus CS angeführt. Sie konnte von mir - in Übereinstimmung mit Martius (2,5,11,49) und Tomizawa (10) - nicht gefunden werden, obwohl die Konzentrationen(im Vergleich zu Krebs und Holzach)mit doppelt so hoher Genauigkeit bestimmt worden sind. Aber auch die Genauigkeit dieser Kontrollbestimmungen ist immer noch nicht ausreichend, um das Vorhandensein einer nur schwach ausgeprägten Induktionsperiode mit völliger Sicherheit auszuschliessen.

Als zum Schluss meiner Versuche ein empfindlicheres Zählrohr zur Verfügung stand, musste aus zeitlichen Gründen auf eine Wiederholung der Isotopenansätze mit ^{14}C-Aconitsäure verzichtet werden.

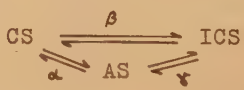
B) Versuche mit ^{14}C-Citronensäure

Da die enzymatischen Versuche mit ^{14}C-Aconitsäure nicht zum Ziel geführt hatten, wurden Isotopenversuche, ausgehend vom enzymatischen Gleichgewichtszustand unternommen.
Verfolgt man im chemischen Gleichgewicht die Einstellung des "Isotopengleichgewichtes", so lässt sich daraus schliessen, ob eine Substanz als Zwischenprodukt einer Umsetzung gelten kann oder nicht (78). Für das enzymatische Gleichgewicht zwischen CS, ICS und AS kommen zwei Möglichkeiten in Frage [+)], die durch Schema I und II wiedergegeben seien.

Schema I



Schema II



α, β, γ, = Austauschgeschwindigkeiten im chemischen Gleichgewicht (bei I: $\beta = 0$).

Im Falle I handelt es sich um das totale Gleichgewicht bei einer Folgereaktion, im Falle II um das vollkommene Gleichgewicht bei einem Reaktionszyklus (vgl. Skrabal 79).

Wie sich mathematisch leicht ableiten lässt, gilt für den Fall I, sofern allein CS markiert vorgegeben ist und man sich zu Anfang des Isotopenaustausches befindet:

Gleichung 1 : $$\frac{[AS^+]}{[AS^+] + [AS]} \geqq \frac{[ICS^+]}{[ICS^+] + [ICS]}$$

+) Für Vorliegen eines Zirkulargleichgewichtes fand ich keine Anhaltspunkte.

Das heisst: Es muss, wenn der Fall I vorliegt, die relative Markierung in AS grösser gefunden werden als die in ICS oder im Grenzfalle, wo γ als unendlich gross gegenüber α anzusehen wäre, in beiden Säuren (AS und ICS) gleich gross. Selbstverständlich ist nach vollkommenem Isotopenaustausch in jedem Falle die relative Markierung in AS ebenso gross wie die in ICS, da ja dann alle drei Säuren zu gleichem Prozentsatz mit ^{14}C markiert vorliegen.

Die Analyse des Isotopenaustausches würde also nur dann hier eine eindeutige Aussage über den Reaktionsweg erlauben, wenn sich zu Anfang der enzymatischen Umsetzung die relative spezifische Aktivität in ICS als grösser erwiese als diejenige in AS, womit AS als zwangsläufiges Zwischenprodukt ausgeschlossen wäre. Dies traf jedoch - wie die auf Seite 36 angeführten Versuche gezeigt haben - nicht zu.

Obwohl also das Ergebnis der Gleichung 1 (Seite 40) genügt, ist damit andererseits noch nicht bewiesen, dass AS notwendiges Zwischenprodukt sei; denn der gleiche Befund müsste sich ja auch dann ergeben, wenn $\alpha \geq \beta$ wäre. Solche unterschiedlichen Austauschgeschwindigkeiten zwischen je zwei von drei Reaktionsteilnehmern eines Reaktionszyklus sind durchaus denkbar, weil das Gleichgewicht damit in keiner Weise gestört wird.

Im Falle der Aconitase ist sogar ein Verhältnis: $\alpha > \beta$ gut mit der hohen Affinität des Enzyms zur Aconitsäure vereinbar.

Eine rechnerische Behandlung der Versuchsergebnisse im Rahmen der Ein - Ferment - Theorie (Freksa und Martius, Tomizawa, Speyer) wird in der Discussion angeführt.

C) Discussion

Wie im Vorstehenden ausgeführt, liefern meine Versuche mit ^{14}C-Aconitsäure und mit ^{14}C-Citronensäure kein eindeutig zu interpretierendes Ergebnis. Die Befunde sind einmal mit der Auffassung vereinbar, die von Krebs und Holzach, von Racker und von Peters vertreten wird (d.h.: Ein Ferment,aber Folgereaktion)(12,6,14). Zum anderen sind meine Befunde ebenso auch vereinbar mit der Theorie von Freksa und Martius, Tomizawa und Speyer (d.h.: Ein Ferment und Reaktionszyklus)(11,10,13,16,17). Um das zu zeigen,wurde eine Überschlagsrechnung ausgeführt +) wie sie Tomizawa bei seinen Untersuchungen angestellt hat (16).

Prinzip der Rechnung nach Tomizawa :
Es wird das Verhältnis der Aktivierungsgeschwindigkeiten++) der drei Substrate (1 [CS] : 45 [AS] : 10 [ICS]) benutzt zur Berechnung derjenigen spezifischen Aktivität, die nach kurzer Reaktionszeit in den ursprünglich nicht markierten Verbindungen zu finden sein sollte.

Berechnung für die Gleichgewichtsversuche (S.36):

Versuch I :
CS : 89,2 % ICS : 6,2 % AS : 4,4 %
Ansatz: 1 [CS] : 10 [ICS] : 45 [AS] = 89,2:62:198
daraus:

$$\frac{[A^+]}{[A^+] + [A]} = \frac{198}{349,2} \cdot 100 = 56,8\ \%$$

und :

$$\frac{[ICS^+]}{[ICS^+] + [ICS]} = \frac{62}{349,2} \cdot 100 = 17,8\ \%$$

+) Die Rechnung ist nur für die Gleichgewichtsversuche angegeben, weil hier die Versuchsdaten am besten gesichert sind.

++) Tomizawa hat dieses Verhältnis aus den Michaeliskonstanten und den einzelnen Anfangsgeschwindigkeiten errechnet (13).

Versuch II :

CS : 88,3 % ICS : 7,6 % AS : 4,2 % [+)]

Ansatz: 1[CS]: 10 [ICS] : 45 [AS] = 88,3:76:189
daraus:

$$\frac{[AS^+]}{[AS^+]+[AS]} = \frac{189}{353,3}\,100 = 53,5\ \%$$

$$\frac{[ICS^+]}{[ICS^+]+[ICS]} = \frac{76}{353,3}\,100 = 21,5\ \%$$

In der folgenden Übersicht sind die so berechneten Verhältnisse der relativen Aktivitäten in AS und ICS ($[A^+]/[A^+] + [A] : [ICS^+]/[ICS^+] + [ICS]$ = "A" : "I") den experimentell gefundenen Aktivitätsverhältnissen gegenübergestellt. Die Übereinstimmung ist befriedigend.

Versuch	I	II a	II b
"I" : "A"			
Ber.	3,2 : 1	2,5 : 1	2,5 : 1
Gef.	3 : 1	2,6 : 1	2,4 : 1

+) Die Substratkonzentrationen im Gleichgewicht wurden in diesem Falle etwas anders gefunden als beim Versuch I, vgl. S. 35, Anmerkg. und S. 36 .

Zum Schluss möchte ich nochmals auf die schon zitierte Arbeit von Speyer (17) eingehen, die gegen Ende meiner Untersuchungen erschienen ist. Nach Angabe des Autors, der Versuche mit Aconitäse in D_2O-haltiger Lösung unternommen hat, bestätigen seine Befunde die Schlussfolgerungen von Freksa und Martius (11) und von Tomizawa (10,13,16), wonach AS "kein obligatorisches Zwischenprodukt in der Citrat-Isocitrat-Bildungskette" ist. Leider erschwert das Fehlen genauer Angaben über die angewandten Versuchsbedingungen eine kritische Bewertung der Arbeit (vgl. Bonhoeffer:77). Der Autor folgert in der Veröffentlichung aus seinen Versuchsdaten: Von allen drei Substraten wird ein gemeinsamer "carbonium ion-ferrous iron-enzyme complex" gebildet. Dieser Komplex würde der von Freksa und Martius und von Tomizawa angenommenen Enzym - Zwischenverbindung ("Activated complex") entsprechen.

Nachtrag

Die nach Abschluss dieser Arbeit erschienene ausführliche Veröffentlichung von J.F. Speyer und S.R. Dickman (J.B.C. 220 193 (1956)) bestätigt die Richtigkeit der Ergebnisse von Speyer (17). Nachdem nun von zwei Autoren (Tomizawa (16) ; Speyer (17)) durch verschiedenartige Versuche mit isotop markierten Substraten die Möglichkeit eines direkten enzymatischen Überganges CS $\rightleftharpoons$ ICS gesichert ist, kann die von Freksa und Martius aufgestellte Ein - Ferment - Theorie als bewiesen gelten.

D) Zusammenfassung

Es wird die Darstellung von Aconitsäure beschrieben, deren primäre Karboxylgruppe durch ^{14}C markiert ist.

Mittels dieser markierten Aconitsäure und einer daraus enzymatisch gewonnenen markierten Citronensäure ist die Frage untersucht worden, ob Aconitsäure als obligatorisches Zwischenprodukt bei der Aconitase-Reaktion zu gelten hat, oder ob ein direkter enzymatischer Übergang CS $\rightleftharpoons$ ICS möglich ist.

Meine Versuchsergebnisse haben nicht zu einer eindeutigen Entscheidung geführt. Sie sind mit beiden Auffassungen vereinbar.

Ich selber halte die von Tomizawa vertretene Überzeugung, die eine Verfeinerung der Theorie von Freksa und Martius darstellt, für die allen bisher zu diesem Thema angestellten Versuchen am besten entsprechende Theorie.

V ANHANG

Formelblatt

I Abkürzungen

AS = cis-Aconitsäure
CS = Citronensäure
ICS = Isocitronensäure
E = Enzym

AS^+ = ^{14}C-cis-Aconitsäure
CS^+ = ^{14}C-Citronensäure
ICS^+ = ^{14}C-Isocitronensäure
[AS] = Konzentration an AS, entsprechend bei CS u. ICS

II Formulierungen der enzymatischen Reaktion

Freksa und Martius

1. Ein - Ferment - Theorie :

a) $CS \underset{\text{Aconitase}}{\rightleftharpoons} AS$ folgt $AS \underset{\text{Aconitase}}{\rightleftharpoons} ICS$

b) $E + CS \rightleftharpoons$
$E + ICS \rightleftharpoons EX$
$E + AS \rightleftharpoons$

2. Zwei - Ferment - Theorie:

$CS \underset{\text{Enzym I}}{\rightleftharpoons} AS$ folgt $AS \underset{\text{Enzym II}}{\rightleftharpoons} ICS$

Kacser

$$\begin{array}{ccccc} E + CS & & E + AS & & E + ICS \\ \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow \\ ECS & \rightleftharpoons & EAS & \rightleftharpoons & EICS \end{array}$$ +)

Tomizawa

$$E + CS \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ECS \xrightarrow{k_3} ES \quad (\text{Activated complex})$$
$$E + AS \rightleftharpoons EAS \rightleftharpoons ES$$
$$E + ICS \rightleftharpoons EICS \rightleftharpoons ES$$

$k_1 \gg k_2 \gg k_3 \gg ; \quad k_3 \ll k_4$

+) Die Formulierung ist nicht exakt, sondern sinngemäss wiedergegeben, da mir im Original ein Druckfehler vorzuliegen scheint.

Literaturnachweis 1

1) M a r t i u s , C. in: Flaschenträger,B. u. E. Lehnartz, Physiol.Chem. II, 1b 1025 (1954).
K r e b s , H.A., Angew.Chem. 66 313 (1954).
O c h o a , S., Advances in Enzym. 15 183 (1954).
M a r t i u s , C., H.S. 247 104 (1937).

2) M a r t i u s , C., H.S. 257 29 (1939).

3) J a c o b s o h n , K.P. u. J. T a p a d i n h a s , Enzymol. 5 388 (1938/39).

4) J a c o b s o h n , K.P., M. S o a r e s u. J. T a p a - d i n h a s , Bull.Soc.Ch.Biol. 22 48 (1940).

5) M a r t i u s , C. u. H. L e o n h a r d t , H.S. 278 208 (1943).

6) R a c k e r , E., Biochim.et Biophys.Acta 4 211 (1950).

7) B u c h a n a n , J.M. u. C.B. A n f i n s e n, J.B.C. 180 47 (1949).

8) D i c k m a n , S.R. u. A.A. C l o u t i e r, Arch.of Biochem.a.Biophysics, 25 229 (1950).

9) D i c k m a n , S.R. u. A.A. C l o u t i e r , J.B.C. 188 379 (1951).

10) T o m i z a w a , J.I., J.of Biochem.(Tokyo) 40 351 (1953).

11) F r i e d r i c h - F r e k s a , H. u. C. M a r t i u s , Z.f.Naturf. 6b 296 (1951).

12) K r e b s , H.A. u. O. H o l z a c h , Biochemic.J. 52 527 (1953).

13) T o m i z a w a , J.I., J.of Biochem.(Tokyo) 40 339 (1953).

14) P e t e r s , R.A., Referat b.d.Tagung d.Faraday Soc., "Physical Chemistry of Enzymes", Oxford, 1955.

15) K a c s e r , H., Biochim.Biophysica Acta 9 406 (1952).

16) T o m i z a w a , J.I., J.of Biochem.(Tokyo) 41 567 (1954).

17) S p e y e r , J.F., Fed.Proc. 14 284 Nr. 921 (1955).

18) M o r r i s o n , J.F., Biochem.J. 56 99 (1954).

19) N e i l s o n , N.E.,Biochim.et Biophys.Acta 17 139 (1955).

20) C a m p b e l l , J.J.R., R.A.Smith u. B.A.Eagles, Biochim.et Biophys.Acta 11 594 (1953).

21) C a l v i n ,M. u.M., "Isotopic Carbon" (New York 1949) S. 179,216,192.

22) B r u c e , W.F., Organic Synth.,Coll.Vol. II, 12 (1948).

Literaturnachweis 2

23) M i c h a e l ,A.,J.f.prakt.Chem.(N.F.) 49 20 (1894).

24) C a l v i n ,M. u.M., "Isotopic Carbon" (New York 1949).

25) a) H a u s e r ,Ch.R., R. L e v i n e u. R.F. K i b l e r , J.Amer.Chem.Soc. 68 26 (1946).
b) B a u m g a r t e n , E. u. Ch.R. H a u s e r , J.Amer.Chem.Soc. 66 1037 (1944).
c) V a u g h n ,Th.H., R.R. V o g t u. J.A. N i e u w - l a n d , J.Amer.Chem.Soc. 56 2120 (1934).

26) a) L u n d ,H., A.Uch H a n s e n u. A.F. V o i g t , Kgl.Dan.Vid.Selsk.Math.fys.Medd. 12 9 (1933).
b) L u n d ,H., Ber. 67 935 (1934).
c) S m i t h ,L.I. u. P.F. W i l e y , J.Amer.Chem.Soc. 68 889 u. 892 (1946).

27) N o r r i s ,J.F. u. G.W. R i g b y , J.Amer.Chem.Soc. 54 2097/98 (1932).

28) M a r t i u s ,C., H.S. 247 105 (1937).

29) a) M a l a c h o w s k i,R. u. M. M a s l o w s k i , Ber. 61 2521 (1928).
M a l a c h o w s k i,R. , M. G i e d r o y ć u. Z. J e r z m a n o w s k a , Ber. 61 2525 (1928)
b) M a l a c h o w s k i,R., Bull.Int.Acad.Polon.Sciences Lettres.Serie A.1931 369 - 82,zit.nach:C.Z.1931 II 3595.

30) N e l s o n , E.K., J.Amer.Chem.Soc. 47 568 (1925).

31) N e l s o n , E.K., J.Amer.Chem.Soc. 52 2931 (1930).

32) B r u c e , W.F., J.Amer.Chem.Soc. 57 1725 (1935).

33) P u c h e r , G.W., M.D. A b r a h a m s u. H.B. V i c k e r y , J.B.C. 172 579 (1948).

34) V i c k e r y , H.B. Biochem.Prepar. 3 44-51 (1953),zitiert nach: C.A. 48 10 592 c (1954).

35) F i t t i g , R. u. H.E. M i l l e r , Ann. 255 43 (1889).

36) G r e e n s t e i n , J.P. u.M., J.Am.Chem.Soc. 77 707 u. W i n i t z , M. u.M., J.Am.Chem.Soc. 77 716 (1955).

37) M a r t i u s , C. u. D. N i t z - L i t z o w , Ber. 85 605 (1952).

38) a) M a r t i n , A.J.P. u. R.L.M. S y n g e , Biochemic.J. 35 1358 (1941).

Literaturnachweis 3

38) b) R a u e n , H.M., in: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Hdb.d.Physiol.-u.Pathol.-Ch.Analyse I,1 200 (1953).
c) T u r b a , F., Chromatogr.Method. in der Proteinchemie, Springer - Verlag, 1954.

39) F r o h m a n , Ch.E.,J.M. O r t e n u. A.H. S m i t h , J.B.C. 193 277 (1951).

40) B u s c h , H., R.B. H u r l b e r t u. V.R. P o t t e r , J.B.C. 196 721/723 (1952).

41) B u l e n , W.A., J.E. V a r n e r u. R.C. B u r r e l l , Analyt.Chem. 24 187 (1952).

42) I s h e r w o o d , F.A., Biochemic.J. 40 688 (1946).

43) P h a r e s , E.F. u.M., Analyt.Chem. 24 660 (1952).

44) S w i m , H.E. u. L. O. K r a m p i t z , J.of Bacteriology 67 419 (1954).
S a z , H.J. u. L.O. K r a m p i t z , J.of Bacteriology 67 409 (1954).

45) A l m ,R.S., R.J.P. W i l l i a m s u. A. T i s e l i u s , Acta Chemica Scand. 6 826 (1952).

46) T i s e l i u s , A., Endeavour 11 13 (1952).

47) H u r l b e r t , R.B. u.M., J.B.C. 209 23 (1954).

48) G ö t t e , H. in : Houben-Weyl, Meth.d.Org.Ch. III/1 751 (1955).

49) M a r t i u s , C. u. F. L y n e n , Adv.in Enzymol. 10 193 (1950).

50) K r e b s , H.A. u. L.V. E g g l e s t o n , Biochemic.J. 37 334 (1943).

51) E g g l e s t o n , L.V. u. H.A. K r e b s , Biochemic.J. 45 578 (1949).

52) L u t z , O. u. B. J i r g e n s o n s , Ber. 65 784(1932).

53) M i c h a e l , A.,J.f.prakt.Chem.(N.F.) 46 224 (1892).

54) a) C u r t i u s , Th. u. L.H. H e y n e m a n n , J.f.prakt.Chem.(N.F.) 91 66 (1915).
b) B a u d r o w s k i , E., Ber. 15 2694 (1882).

55) R u h e m a n n , S. u. F. B e d d o w , J.Chem.Soc. (Transact.) 77 1121 (1900).

56) V o s s , W. u. E. B l a n k e , Ann. 485 258u.272 (1931).

Literaturnachweis 4

57) Buchner, E., Ber. 22 2929 (1889).
58) Kailan, A.u.R. Raff, Monatsh.Ch. 61 118 (1932).
59) Eistert, B., in: Neuere Meth.d.pr.org.Ch.I, 395 (1949). (Verl.Chemie)
60) Krebs, H.A. u. L.V. Eggleston, Biochemic.J. 38 432 (1944).
61) Pucher, G.W. u. H.B.Vickery, J.B.C.163 178(1946).
62) Cramer, F., "Papierchromatographie", Verl.Chemie, 1952.
63) a) Liberman, L.A., A. Zaffaroni u. E. Stotz, J.Amer.Chem.Soc. 73 1387 (1951).
b) Jones, A.R., E.J. Dowling u. W.J. Skraba, Analyt.Chem. 25 394 (1953).
c) Brown, F., Nature 167 441 (1951).
64) Lugg, J.W.H. u. B.Overell, Nature 160 87 (1947).
65) a) Kirchner, J.G. u. G.T. Keller, J.Amer.Chem.Soc. 72 1867 (1950).
b) Rauen, H.M.(wie 38 b): Hdb. Bd. I/1,221 (1953).
66) a) Zimmermann, G.u. K. Nehring, Angew.Chem. 63 556 (1951).
b) Mohan Rao, V.K., Experientia IX 151 (1953).
67) Cheftel, R.J., R. Munier u. E. Macheboeuf, Bull.Soc.chim.biol.35 1095-9(1953), zit.n.C.A.48 6914a(1954).
68) Dent, C.E., Biochemic.J. 41, 245 (1947).
69) Weygand, C., Org.-ch.Experimentierkunst, 2.A.(1948).
70) Marvel, C.S. u. R.D. Rands, J.Amer.Chem.Soc. 72 2642 (1950).
71) Peterson, M.H. u. M.J. Johnson, J.B.C.174 778 (1948).
72) Ambler, J.A. u. E.J. Roberts, J.Org.Ch.13 399 (1948).
73) Dickman, S.R.u.A.A. Cloutier, J.B.C. 188 382 (1950).
74) Hargreaves, II, Ch.A., M.D. Abrahams u. H.B. Vickery, Analyt.Chem. 23 470 (1951).
75) Ochoa, S. "The Enzymes", Bd.I/2 1236 (1951)(New York).
76) Krebs, H.A., Biochemic.J. 54 78 (1953).
77) Bonhoeffer, K.F., Erg.d.Enzymf. 6 47 (1937).
78) Meyerhof, O. u.M., Biochem.Zeitschr. 298 396 (1938).
79) Skrabal, A., D.Chem.Reakt. Bd.V, Homogenkinetik, 1941.+)
80) Kamen, M.D., "Radioactive Tracers in Biology", 1951. (New York).

+) Th.Steinkopf-Verlag, Dresden u. Leipzig.

L e b e n s l a u f

Am 28.10.1918 wurde ich, Ursula Olpp, als Tochter des Pfarrers Theodor Olpp und seiner Frau Maria, geb. Metzler, in Levern (Westf.) geboren. Dort besuchte ich 1925-29 die Volksschule, in Bielefeld 1929-35 die Cecilienschule. Die Reifeprüfung legte ich 1938 nach zweijährigem Besuch des Staatl. Reform-Realgymnasiums in Bad Harzburg ab.
Anschliessend: 1938 hauswirtschaftliches Jahr; 1939 RAD; 1942 Staatsexamen als Medizinisch-Technische Assistentin (Giessen); 1942-44 Anstellung im Physiologisch-Chemischen Institut in Tübingen (Professor Ohlmeyer).
1944 studierte ich ein Semester Chemie in Tübingen, kam danach zum Kriegseinsatz an das dortige Physiol.-Chem. Institut zurück.
Im Herbst 1945 nahm ich das Studium in Tübingen wieder auf: 1947 Diplom-Chemiker-Vorprüfung, 1950 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung, 1952 Abschluss der Diplomarbeit bei Herrn Professor Martius; unter seiner Leitung begann ich in Tübingen im Physiologisch-Chemischen Institut meine Doktorarbeit und beendete sie in Würzburg.

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG GOLDSTEINSTR. 1